

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

1c872 U.S. PRO
09/942563
08/31/01

In re U.S. Patent Application of)
NARAHARA et al.)
Application Number: To be assigned)
Filed: Concurrently herewith)
For: NUCLEIC ACID ARRAYS AND METHOD)
FOR DETECTING NUCLEIC ACID BY USING)
ARRAYS OF NUCLEIC ACID)

#5

Honorable Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231

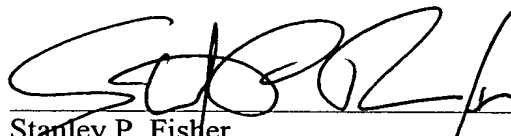
**REQUEST FOR PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. § 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of January 9, 2001, the filing date of the corresponding Japanese patent application 2001-001761.

The certified copy of corresponding Japanese patent application 2001-001761 is submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copy is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,



Stanley P. Fisher

Registration Number 24,344

REED SMITH HAZEL & THOMAS LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200

JUAN CARLOS A. MARQUEZ
Registration No. 34,072

August 31, 2001

(Translation)

J-872 U.S. PTO
09/942563
08/31/01

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the
following application as filed with this Office.

Date of Application: January 9, 2001
Application Number: Japanese Patent Application
No. 001761/2001
Applicant(s): Hitachi, Ltd.



June 29, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3061569

Sir:

Transmitted herewith for filing is the Utility patent application of:

INVENTOR:	Masatoshi NARAHARA, Tohio SAITO, Hiroyuki TOMITA and Hirokazu KATO
FOR:	NUCLEIC ACID ARRAYS AND METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACIDS BY USING NUCLEIC ACID ARRAYS

Enclosed are:

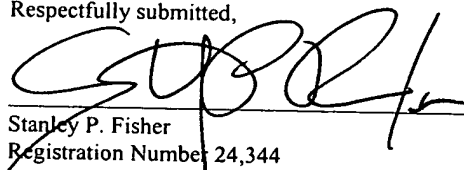
- ☒ 7 sheets of ☐ formal ☐ informal drawings.
- ☒ Transmittal of certified copy of Japanese application 2001-001761 to claim priority date of January 9, 2001.
- ☒ An Information Disclosure Statement with PTO Form 1449.
- ☒ An assignment of the invention to Hitachi, Ltd.
- ☒ A Sequence Listing with diskette.
- ☒ An Executed Declaration.

☒ The filing fee is calculated as shown below:

FOR	NUMBER FILED		NUMBER EXTRA	RATE	CALCULATIONS
TOTAL CLAIMS	8	-20	0	x\$18 =	0.00
INDEPENDENT CLAIMS	2	-3	0	x\$80 =	0.00
MULTIPLE DEPENDENT CLAIM(S) (if applicable)				+\$270 =	\$0.00
				BASIC FEE	\$710.00
				TOTAL OF ABOVE	710.00
REDUCTION BY 1/2 FOR FILING BY SMALL ENTITY (note 37 C.F.R. §§ 1.9, 1.27, 1.28). IF APPLICABLE, VERIFIED STATEMENT MUST BE ATTACHED					
				TOTAL	710.00

- ☐ Please charge my **Deposit Account Number** _____ in the amount of _____ to cover the filing and assignment recordation fees. A duplicate copy of this paper is enclosed.
- ☒ A check in the amount of **\$750.00** to cover the filing and assignment recordation fees is enclosed.
- ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees associated with this communication, including patent application filing fees and processing fees under 37 C.F.R. § 1.16 and 1.17, or credit any overpayment to **Deposit Account Number 08-1480**.

Respectfully submitted,


Stanley P. Fisher
Registration Number 24,344

JUAN CARLOS A. MARQUEZ
Registration No. 34,072

REED SMITH HAZEL & THOMAS LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200
August 31, 2001

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

1c872 U.S. PTO
09/942563
08/31/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 1月 9日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-001761

出 願 人

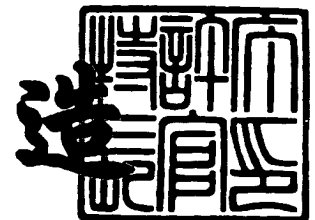
Applicant(s):

株式会社日立製作所

2001年 6月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3061569

【書類名】 特許願

【整理番号】 H002034

【提出日】 平成13年 1月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 株式会社 日立製作所 ライフサイエンス推進事業部内

 【氏名】 奈良原 正俊

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 株式会社 日立製作所 ライフサイエンス推進事業部内

 【氏名】 斎藤 俊郎

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 株式会社 日立製作所 ライフサイエンス推進事業部内

 【氏名】 富田 裕之

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 株式会社 日立製作所 ライフサイエンス推進事業部内

 【氏名】 加藤 宏一

【特許出願人】

 【識別番号】 000005108

 【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸マイクロアレイ及びそれを用いた核酸検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸ターゲットに対してハイブリダイゼーション可能な多種類の一本鎖核酸プローブが支持体上のそれぞれ異なる位置に固定化された核酸マイクロアレイにおいて、前記一本鎖核酸プローブが支持体上に共有結合で固定化され、且つ、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に、水溶液中で解離することにより負に帯電することが可能な官能基が存在することを特徴とする、核酸マイクロアレイ。

【請求項2】 上記負に帯電することが可能な官能基は、一本鎖核酸プローブを支持体上に固定化した後、一本鎖核酸プローブが固定化されていない領域に負に帯電することが可能な官能基を有する化合物を共有結合で固定化することにより導入された官能基であることを特徴とする、請求項1に記載の核酸マイクロアレイ。

【請求項3】 上記負に帯電することが可能な官能基がカルボキシル基であることを特徴とする、請求項2に記載の核酸マイクロアレイ。

【請求項4】 上記負に帯電することが可能な官能基は、一本鎖核酸プローブを支持体上に固定化した後、一本鎖核酸プローブが固定化されていない領域に負に帯電することが可能な官能基を有する化合物を疎水性結合で固定化することにより導入された官能基であることを特徴とする、請求項1に記載の核酸マイクロアレイ。

【請求項5】 上記負に帯電することが可能な官能基がカルボキシル基、スルホン酸基、硫酸水素基のいずれかであることを特徴とする、請求項4に記載の核酸マイクロアレイ。

【請求項6】 核酸ターゲットに対してハイブリダイゼーション可能な多種類の一本鎖核酸プローブが支持体上のそれぞれ異なる位置に固定化された核酸マイクロアレイにおいて、前記一本鎖核酸プローブが支持体上に共有結合で固定化され、且つ、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に加水分解されることで負に帯電している官能基が存在していることを特徴とする、核酸

マイクロアレイ。

【請求項 7】 上記負に帯電している官能基は、加水分解される前は核酸プローブが有する官能基と反応可能であり、核酸プローブを固定化した後核酸プローブが固定化されていない領域を加水分解することにより生成した官能基であることを特徴とする、請求項 6 に記載の核酸マイクロアレイ。

【請求項 8】 上記負に帯電している官能基が、マレイミド基の加水分解生成物であることを特徴とする、請求項 7 に記載の核酸マイクロアレイ。

【請求項 9】 多種類の一本鎖核酸プローブが支持体上のそれぞれ異なる位置に共有結合で固定化され、且つ、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な官能基が存在することを特徴とする核酸マイクロアレイを用いて核酸ターゲットをハイブリダイゼーションにより検出する、核酸検出方法。

【請求項 10】 上記負に帯電することが可能な官能基は、一本鎖核酸プローブを支持体上に固定化した後、一本鎖核酸プローブが固定化されていない領域に、負に帯電することが可能な官能基を有する化合物を共有結合で固定化することにより導入された官能基であることを特徴とする、請求項 9 に記載の核酸検出方法。

【請求項 11】 上記負に帯電することが可能な官能基は、一本鎖核酸プローブを支持体上に固定化した後、一本鎖核酸プローブが固定化されていない領域に、負に帯電することが可能な官能基を有する化合物を疎水性結合で固定化することにより導入された官能基であることを特徴とする、請求項 9 に記載の核酸検出方法。

【請求項 12】 多種類の一本鎖核酸プローブが支持体上のそれぞれ異なる位置に共有結合で固定化され、且つ、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に加水分解されることで負に帯電している官能基が存在していることを特徴とする核酸マイクロアレイを用いて核酸ターゲットをハイブリダイゼーションにより検出する、核酸検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は核酸ターゲットをハイブリダイゼーションにより検出する核酸マイクロアレイ及びそれを用いた核酸検出方法に関わり、詳細には核酸ターゲットのハイブリダイゼーション量を増やすと同時に核酸プローブが固定化されていない領域への核酸ターゲットの吸着を抑制してノイズを減らすことで核酸ターゲットの検出感度を高めた核酸マイクロアレイ、及びそれを用いた核酸検出方法を提出するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、ゲノムから転写されたトランスクリプトームを解析する技術として、マイクロアレイが注目を集めている。マイクロアレイは、数千または数万といった数の遺伝子についてその発現を同時に観察することができる。マイクロアレイの原理は、数種類の核酸プローブを支持体上に固定化し、そこに標識化した核酸ターゲットをハイブリダイズさせるものである。核酸プローブと相補的な塩基配列を持つ核酸ターゲットは、配列されたプローブ分子と特異的にハイブリダイズする。この後、核酸プローブ上でハイブリダイズしている標識化された核酸ターゲットのシグナルを測定することでハイブリダイズしている核酸ターゲットを同定するとともに、ハイブリダイズしている量を測定することができる。蛍光標識された核酸ターゲットを用いる場合は、ハイブリダイズしている領域の蛍光シグナル値からハイブリダイズしていない領域のシグナル値であるバックグラウンドを差し引いた値が検出量となるため、ハイブリダイズしている領域の蛍光シグナル値を高め、バックグラウンド値を低くすることで検出感度を高めることができる。このようなマイクロアレイを作成する方法として、USP第5807522号ではアミノ基を有する樹脂が塗布された支持体上に二本鎖cDNAプローブをスポットで高密度に張り付け、その後二本鎖cDNAプローブを熱変性した後、cDNAプローブが固定化されていない領域を無水コハク酸で処理してハイブリダイゼーション時の核酸ターゲットの吸着をブロックする方法が開示されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、USP第5807522号では、二本鎖cDNAプローブが支持体上のアミノ基とプローブ間の静電的結合で固定化されているのでその結合が弱く、鎖長の長いプローブを用いる必要があった。また、ブロッキング処理やハイブリダイゼーション時にcDNAプローブがはがれるため、核酸ターゲットの検出感度が低くなるという問題もある。また、cDNAプローブを固定化した後熱変性を行っているため、支持体上には核酸プローブに由来するセンス鎖だけでなく、アンチセンス鎖も残ってしまう。アンチセンス鎖はそれぞれその対となっていたセンス鎖の近傍に固定された状態にあるため、検出のためのハイブリダイゼーション時に、センス鎖と核酸ターゲットのハイブリダイゼーションと共に、センス鎖とこのアンチセンス鎖のハイブリダイゼーションも競合的に進み、ハイブリダイゼーションの効率が非常に低くなってしまう。

【0004】

ハイブリダイゼーションの効率が高く、核酸プローブがはがれない方法が、「Nucleic Acids Research」、第24巻、3031項（1996）に報告されている。これは、予め合成された一本鎖の核酸プローブを支持体上に共有結合で固定化するものであるが、核酸プローブが固定化されていない領域に核酸ターゲットが吸着するため、バックグラウンドが高くなる。特開平11-187900号では一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化した後、核酸プローブが固定化されていない領域に牛血清アルブミンを吸着させて核酸ターゲットの吸着をブロッキングしているが、牛血清アルブミンは分子量が大きく、ハイブリダイゼーション時に核酸ターゲットが核酸プローブに近づくときの立体障害となりハイブリダイゼーション効率が低くなる。

【0005】

このように、核酸プローブを支持体上に安定に結合させ、かつハイブリダイゼーション効率を上げると共に、検出感度を上げることは容易ではなかった。本発明は、一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化することで核酸プローブのはがれを防止すると同時にハイブリダイゼーションの効率を高め、さらに、核酸プローブが固定化されていない領域表面へ水溶液中で解離して負に帯電することが可能な官能基、または、加水分解されたことで負に帯電している官能基を導入するこ

とで核酸ターゲットの吸着を防止して核酸ターゲットの検出感度を高めた核酸マイクロアレイ、及びそれを用いた核酸検出方法を提供するものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、本発明の核酸マイクロアレイは、核酸ターゲットに対してハイブリダイゼーション可能な多種類の一本鎖核酸プローブが支持体上のそれぞれ異なる位置に固定化された核酸マイクロアレイにおいて、前記一本鎖核酸プローブが支持体上に共有結合で固定化され、且つ、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に、水溶液中で解離することにより負に帯電することが可能な官能基が存在することを特徴とするものである。一本鎖核酸プローブを用いることでハイブリダイゼーションの効率を高めると同時に、一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化することでハイブリダイゼーション中の核酸プローブのはがれを防止する。また、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離することにより負に帯電することが可能な官能基を導入することで、負に帯電している核酸ターゲットと導入された官能基との間の静電的反発を利用して核酸ターゲットの吸着を防止することができる。

【0007】

また、本発明の核酸マイクロアレイは、一本鎖核酸プローブを支持体上に共有結合で固定化した後、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域に解離することにより負に帯電することが可能な官能基を有する化合物を共有結合で固定化して、核酸プローブが固定化されていない領域に水溶液中で解離することにより負に帯電することが可能な官能基を導入することを特徴とするものである。共有結合で導入された官能基はハイブリダイゼーション中にはがれにくく、より効果的に核酸ターゲットの吸着を防止することができる。

【0008】

また、本発明の核酸マイクロアレイは、一本鎖核酸プローブを支持体上に共有結合で固定化した後、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域に解離することにより負に帯電することが可能な官能基を有する化合物を疎水性結合で固定化して、核酸プローブが固定化されていない領域に水溶液中で解離するこ

とにより負に帯電することが可能な官能基を導入することを特徴とするものである。疎水性結合を用いるため、支持体上の官能基の種類によらず解離することにより負に帯電することが可能な官能基を導入することができる。

【0009】

また、本発明の核酸マイクロアレイは、核酸ターゲットに対してハイブリダイゼーション可能な多種類の一本鎖核酸プローブが支持体上のそれぞれ異なる位置に固定化された核酸マイクロアレイにおいて、前記一本鎖核酸プローブが支持体上に共有結合で固定化され、且つ、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に加水分解されたことで負に帯電している官能基が存在することを特徴とするものである。まず、支持体表面上に核酸プローブが有する官能基と反応可能な官能基を導入した後、導入された官能基と核酸プローブが有する官能基を反応させて核酸プローブを固定化する。核酸プローブを固定化後に未反応官能基を加水分解して水溶液中で負に帯電することが可能な官能基を生成する。この方法によると、新たな化合物を用いることなく負に帯電することが可能な官能基を導入することができるので、核酸マイクロアレイの作成コストを削減することができる。

【0010】

また、本発明の核酸検出方法は、支持体上のそれぞれ異なる位置に多種類の一本鎖核酸プローブが共有結合で固定化され、且つ、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な官能基または加水分解されたことで負に帯電している官能基が存在している核酸マイクロアレイを用いることを特徴とするものである。検出感度が高い核酸マイクロアレイを用いて核酸ターゲットを検出するため、再現性や信頼性の高い検出データを得ることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明では、支持体上に一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化した後、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域に水溶液中で解離することによ

り負に帯電することが可能な官能基または加水分解することで負に帯電した官能基を導入する。尚、本明細書において、官能基の解離または加水分解が生じる水溶液は、特に限定するものではないが、 $pH6.0\sim8.0$ の範囲にあるものが好ましい。

【0012】

本発明で用いられる一本鎖核酸プローブと核酸ターゲットは、核酸プローブと核酸ターゲット同士がハイブリダイズすることが可能であれば特に制限はない。ここで言うハイブリダイズとは相補的な塩基配列を持つ2本の核酸同士が水素結合を介してハイブリッド二本鎖を形成することである。この様な組み合わせとしては、DNA/DNA、DNA/RNA、RNA/RNA、DNA/PNA、RNA/PNAまたはPNA/PNA等を挙げる事ができる。

【0013】

本発明で用いられる一本鎖核酸プローブを支持体上に固定化する方法としては、核酸プローブと支持体との双方に互いに反応可能な官能基を導入してこれらを結合する方法が挙げられる（図1参照）。核酸プローブ末端に導入可能な官能基としてはアミノ基またはチオール基がある。一方、支持体上に核酸プローブと反応可能な官能基を導入する方法としては各種Linking試薬を用いる方法がある。Linking試薬は支持体が持つ第一の官能基（図1にXで示す）と反応して、核酸プローブが有する官能基と反応可能な第二の官能基を導入するものである（図1にYで示す）。第二の官能基としては、アミノ基が導入された核酸プローブを用いる場合はイソチオシアネート基、イソシアネート基、イミドエステル基、またはN-ヒドロキシスクシイミド基等がある。また、チオール基が導入された核酸プローブを用いる場合は、ハロアセチル基、マレイミド基、またはジスルフィド基等が挙げられる。用いられるLinking試薬としては、第一の官能基及び核酸プローブが有する官能基ともにアミノ基の場合は、DSG (Disuccinimidyl glutarate) のような二価性のN-ヒドロキシスクシイミド類、1,4-フェニレンジイソシアネートのようなジイソシアネート類、1,4-フェニレンジイソチオシアネートのようなジイソチオシアネート類、またはこれらの官能基を一つずつ有する二価性のLinking試薬が挙げられる。一方、第一の官能基がアミノ基で核酸プローブが有する

官能基がチオール基の場合はGMBS (N-(γ -Maleimidobutyryloxy)succinimide ester) のようなN-ヒドロキシスクシイミド基とマレイミド基を有する二価性の化合物、SIAB (N-Succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate) のようなN-ヒドロキシスクシイミド基とハロアセチル基を有する二価性の化合物、SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate) のようなN-ヒドロキシスクシイミド基とジスルフィド結合を有する二価性の化合物等アミノ基またはチオール基と反応可能な官能基を持つ二価性のLinking試薬が挙げられる。

【0014】

本発明で用いられる支持体の材質としては、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子及びセラミックから選ばれる1種または2種以上が挙げられる。プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミド及びアクリル樹脂等が、無機高分子としては、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル、及びグラファイトが、金属としては、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石等の常温固体金属が、セラミックとしては、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素、及び炭化ホウ素等を例示することができる。上記支持体の形状としては特に制限はないが、核酸ターゲットを蛍光で評価する場合は励起光の散乱を防止するため、板状でより平滑であることが好ましい。

【0015】

本発明で用いられるLinking試薬と反応可能な第一の官能基を支持体上に導入する方法としては、支持体上に官能基を有する樹脂を塗布する方法と支持体表面を化学的に処理する方法が挙げられる。塗布される樹脂としては特に制限はないが、具体的にはポリ-L-リジンの様なLinking試薬と安定な結合を形成するアミノ基を有する樹脂が良い。また、ポリイミドやポリスチレンの様にアミノ基がない樹脂を塗布した後に窒素雰囲気下でプラズマ処理を実施しアミノ基を導入しても良い。化学処理を用いて第一の官能基を導入する方法としては、ガラスや窒化ケイ素のようなケイ素化合物や金属酸化物上にシランカップリング剤を処理する方法や最表面に金の膜が存在する支持体をアルカンチオール類で処理する方法が挙

げられる。

【0016】

また、本発明ではLinking試薬を用いずに支持体上に導入された第一の官能基と核酸プローブが有する官能基を直接反応させて核酸プローブを固定化しても良い。具体的には、グルタルアルデヒドの様なアルデヒド基を有する化合物を支持体上に塗布した後、アミノ基を有する核酸プローブを固定化する。または、エポキシ基を有するシランカップリング剤で支持体を化学処理することでアミノ基を有する核酸プローブを固定化することができる。

【0017】

また、本発明では核酸プローブを支持体に固定化した後、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域に水溶液中で負に帯電することが可能な官能基（図1にAで示す）を導入する。負に帯電することが可能な官能基を導入する方法としては次の3つの方法が挙げられる。1つ目は負に帯電することが可能な官能基を有する化合物を核酸プローブが固定化されていない領域に共有結合で固定化する方法である（図1の左側の流れ）。2つ目は核酸プローブが固定化されていない領域に界面活性剤などの両親媒性物質を疎水性結合で固定化する方法である（図1の左側の流れ）。また、3つ目では支持体上の官能基を加水分解することで負に帯電することが可能な官能基を導入する（図1の右側の流れ）。

【0018】

1つ目の方法の共有結合で固定化される化合物（図1のA）としては、支持体上の官能基と反応するための官能基、及び負に帯電することが可能な官能基の両方を有するものを用いる。支持体上の官能基と反応するための官能基としては、支持体上の官能基と反応して共有結合を形成できれば特に制限はないが、より具体的にはLinking試薬を用いて導入された支持体上の官能基と反応してより安定な共有結合を形成できるアミノ基とチオール基が好ましい。一方、負に帯電することが可能な官能基は、水溶液中で解離して負に帯電することができれば特に制限はないが、より具体的には解離係数が高いカルボキシル基が好ましい。この様な二つの官能基を持つ単分子としては、アミノ基とカルボキシル基を有するアラニンやグリシンのような各種アミノ酸や、チオール基とカルボキシル基を有す

るシステイン等が挙げられる。

【0019】

2つ目の疎水性結合を用いる方法では、分子内に親水性原子団と疎水性原子団を持つ両親媒性物質（図1のA）の水溶液中に核酸プローブ（図1のZ）が固定化された支持体を浸漬する。この時、支持体上の官能基と両親媒性物質の疎水性原子団が疎水性結合することで核酸プローブが固定化されていない領域に負に帯電することが可能な官能基を導入する。本発明で用いられる両親媒性物質としては、水溶液中で解離して負に帯電するような陰イオン性の解離基を持っていれば特に制限はなく、この様な陰イオン性の解離基としてカルボキシル基、スルホン酸基、硫化水素基またはこれらの塩が挙げられる。一方、疎水性原子団としては疎水性であれば特に制限なく、より具体的には長鎖のアルキル鎖、芳香環、またはこれらの中の一つ以上を含む疎水性原子団が挙げられる。

【0020】

3つ目の加水分解を用いる方法では、まず支持体上に核酸プローブが有する官能基と反応可能な官能基（図1のY）を導入した後核酸プローブ（図1のZ）を共有結合で固定化する。その後、支持体を適当なpHの水溶液に浸漬することで核酸プローブが固定化されていない領域の官能基を加水分解して水溶液中で負に帯電することが可能な官能基（図1のY'）を導入する。この様な官能基としては、核酸プローブを有する官能基と反応可能であり、且つ、加水分解を受けることで負に帯電することが可能な官能基に変換するものであれば特に制限はないが、具体的にはN-ヒドロキシスクシイミド基、マレイミド基が挙げられる。

【0021】

本発明で用いられる核酸検出方法は、標識化された核酸ターゲットを検出することができれば特に制限はない。このような検出方法としては、蛍光、リン光、発光または放射線同位体を用いる方法が挙げられる。また、標識化されていない核酸ターゲットを検出する方法として、ハイブリダイゼーションで形成した二本鎖に特殊な化合物をインターキレートさせた後、これらの化合物を発光または電気的に検出することでハイブリダイゼーションの量を検出する方法を用いても良い。

以下実施例をもって本発明を更に詳細に説明する。

【0022】

【実施例】

実施例 1

(1) 支持体洗浄

市販のスライドガラス (Gold Seal Brand社製) をアルカリ溶液 (水酸化ナトリウム ; 50g、蒸留水 ; 150ml、95%エタノール ; 200ml) に室温で2時間浸した。その後、スライドガラスを蒸留水中に移し、3回リンスしてアルカリ溶液を完全に除去した。

【0023】

(2) 核酸プローブを固定化するための官能基の導入

洗浄したスライドガラスを10%のポリ-L-リジン (シグマ社製) 水溶液に1時間浸した後、スライドガラスを引き出しマイクロタイタープレート用遠心機を用いて500r.p.m.で1分間遠心してポリ-L-リジン水溶液を除去した。次に、スライドガラスを吸引式恒温機に入れ、40℃で5分間乾燥させ、スライドガラス上にアミノ基を導入した。さらに、アミノ基が導入されたスライドガラスを1mMのGMBS (PIERCE社製) ジメチルスルホキシド溶液に2時間浸した後、スライドガラスをジメチルスルホキシドで洗浄してスライドガラス表面にマレイミド基を導入した。

【0024】

(3) 一本鎖核酸プローブの固定

DNA自動合成機 (Applied Biosystem社製、model 394 DNA synthesizer) を用いてチオール基が導入された核酸プローブ1を合成した後、高速液体クロマトグラフィーで核酸プローブを精製した。次に、合成・精製された濃度2 μ Mの核酸プローブ1 μ lとHEPES緩衝溶液 (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 ; 10mM、pH6.5) 4 μ lと添加剤 (エチレングリコール) 5 μ lを混合してスポッティング溶液を作成した。調製されたスポッティング溶液をスポッタ (日立ソフト社製 SPBIO 2000) を用いてスライドガラス上の任意の点にスポッティングした後、スライドガラスを室温で2時間放置してスライドガラス上に核酸プローブを固定化した。

核酸プローブ 1 ; HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-5'-GACACAGCAGGTCAAGAGGAGTACA-3' (配列番号 1)

【0025】

(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入

核酸プローブが固定化されたスライドガラスを HEPES 緩衝溶液で pH が 6.5 に調整された 100mM システイン (和光純薬社製) 溶液に 2 時間浸して、核酸プローブが固定化されていない領域に共有結合を用いて解離することで負に帯電することが可能な官能基を導入した。

【0026】

(5) ハイブリダイゼーション反応

DNA 自動合成機を用いて核酸プローブ 1 と相補的な塩基配列を持ち、5' がテキサスレッドで蛍光標識された核酸ターゲットを合成した。次に、濃度 0.1 μM の核酸ターゲット 8 μl と 20×SSC (和光純薬社製) 1.7 μl と 10% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (ライフテック オリエンタル社製) 0.3 μl を加えハイブリダイゼーション溶液を調製した。その後、スライドガラス上に調製したハイブリダイゼーション溶液を滴下しカバーガラスを乗せた後、40℃ の恒温槽内に 12 時間放置してハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、20×SSC の 10 倍希釈液と 10% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液の 300 倍希釈液との混合液中にスライドガラスを浸してカバーガラスをはずした後、20×SSC の 100 倍希釈液でスライドガラスを洗浄した。最後に、マイクロタイタープレート用遠心機を用いてスライドガラス上の水分を除いた後、マイクロアレイ用スキャナー (GSI Lumonics 社製 Scan Array 5000) を用いて核酸プローブが固定化された領域の蛍光強度 (ハイブリダイゼーションシグナル) と核酸プローブが固定化されていない領域の蛍光強度 (バックグラウンドシグナル) を測定して、結果を図 2 及び図 3 に示した。

【0027】

本実施例では一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化した後、核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能なカルボキシル基を共有結合を用いて導入した。ハイブリダイゼーション時に核酸プ

ローブがはがれることなく、且つ、核酸ターゲットの吸着も抑えることができたため、高いハイブリダイゼーションシグナルが得られると同時に、バックグラウンドシグナルも低くすることができた。

【0028】

実施例 2

実施例 1 における各工程のうち、(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入を以下の様に変更した。

(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入

核酸プローブが固定化されたスライドガラスを10mMのドデシル硫酸ナトリウム（和光純薬社製）に2時間浸した。

【0029】

本実施例では、一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化した後、核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な硫酸水素基を疎水性結合を用いて導入した。実施例 1 と同様の効果で高いハイブリダイゼーションシグナルを得ると同時に、バックグラウンドシグナルも抑えることができた。

【0030】

実施例 3

実施例 1 における各工程のうち、(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入を以下の様に変更した。

(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入

核酸プローブが固定化されたスライドガラスをEPPS緩衝溶液（3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸；50mM、pH8.0）に浸した。

【0031】

本実施例では、一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化した後、核酸プローブが固定化された支持体をアルカリ水溶液に浸すことでマレイミド基を加水分解して核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で負に帯電することが可能な官能基を導入した。実施例 1 と同様の効果で高いハイブリダイゼーションシグナルを得ると同時に、バックグラウンドシグナルも抑えることができた。

【0032】

実施例 4

実施例 1 における各工程のうち、(2) 核酸プローブを固定化するための官能基の導入を以下の様に変更した。

(2) 核酸プローブを固定化するための官能基の導入

洗浄したスライドガラスを1%の3-アミノプロピルトリエトキシシラン (Aldrich社製) の95%エタノール水溶液に1時間浸した後、スライドガラスを引き出しマイクロタイタープレート用遠心機を用いて500r.p.m.で1分間遠心して反応溶液を除去した。次に、スライドガラスを吸引式恒温機に入れ、120℃で1時間ベークしてスライドガラス上にアミノ基を導入した。さらに、アミノ基が導入されたスライドガラスを1mMのGMBSジメチルスルホキシド溶液に2時間浸した後、スライドガラスをジメチルスルホキシドで洗浄した。

【0033】

本実施例では、実施例 1～3 とは異なる方法で支持体上にLinking試薬と反応可能な官能基を導入した後、実施例 1～3 同様にLinking試薬を介して一本鎖核酸プローブを固定化した。その後、実施例 1 と同様に核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能なカルボキシル基を共有結合を用いて導入した。本実施例でも実施例 1 と同様に核酸プローブのはがれを防止するとともに核酸ターゲットの吸着を防止することができ、高いハイブリダイゼーションシグナルと低いバックグラウンドシグナルの両立を達成することができた。

【0034】

実施例 5

実施例 4 における各工程のうち、(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入を実施 2 と同様の方法で行った。

本実施例では、実施例 4 の方法で支持体上に官能基を導入してから一本鎖核酸プローブを固定化した後、実施例 2 の方法で核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な硫酸水素基を疎水性結合を用いて導入した。実施例 1 と同様の効果で高いハイブリダイゼーションシグ

ナルと低いバックグラウンドシグナルの両立を達成した。

【0035】

実施例 6

実施例 4 における各工程のうち、(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入を実施例 3 と同様の方法で行った。

本実施例では、実施例 4 の方法で支持体上に官能基を導入してから一本鎖核酸プローブを固定化した後、核酸プローブが固定化された支持体をアルカリ水溶液に浸すことでマレイミド基を加水分解して核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で負に帯電することが可能な官能基を導入した。実施例 1 と同様の効果で高いハイブリダイゼーションシグナルと低いバックグラウンドシグナルの両立を達成した。

【0036】

実施例 7

実施例 1 における各工程のうち、(2) 核酸プローブを固定化するための官能基の導入と (3) 一本鎖核酸プローブの固定及び (4) 負に帯電することが可能な官能基の導入を以下の様に変更した。

(2) 核酸プローブを固定化するための官能基の導入

洗浄したスライドガラスを1%の3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (Aldrich社製) の95%エタノール水溶液に1時間浸した後、スライドガラスを引き出しマイクロタイタープレート用遠心機を用いて500r.p.m.で1分間遠心して反応溶液を除去した。次に、スライドガラスを吸引式恒温機に入れ、120℃で1時間ベークしてスライドガラス上にエポキシ基を導入した。

【0037】

(3) 一本鎖核酸プローブの固定

DNA自動合成機 (Applied Biosystem社製、model 394 DNA synthesizer) を用いて、アミノ基が導入された核酸プローブ2を合成した後、高速液体クロマトグラフィーにて核酸プローブを精製した。次に、合成・精製された濃度10 μ Mの核酸プローブ5 μ lと濃度0.2Mの水酸化カリウム水溶液5 μ lを混合してスポッティング溶液を作成した。さらに、調整されたスポッティング溶液をスポッタ (日立ソフ

ト社製 SPBIO 2000) を用いてスライドガラス上の任意の点にスポッティングした後、スライドガラスを37℃の飽和水蒸気下に6時間放置してスライドガラス上に核酸プローブを固定化した。

核酸プローブ 2 ; $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}-5'-\text{GACACAGCAGGTCAAGAGGAGTACA}-3'$ (配列番号 1)

【0038】

(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入

核酸プローブが固定化されたスライドガラスをCHES緩衝溶液 (N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid; 10mM) でpHが9.0に調整された37℃の100mM DL- α -アラニン (和光純薬社製) 溶液に6時間浸した。

【0039】

本実施例では、実施例1～6とは異なり支持体上に一本鎖核酸プローブが持つ官能基と反応可能な官能基を導入した後、Linking試薬を用いずに一本鎖核酸プローブを支持体上に直接固定化した。その後、実施例1と同様の方法で核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能なカルボキシル基を共有結合を用いて導入した。本実施例でも実施例1と同様の効果で高いハイブリダイゼーションシグナルと低いバックグラウンドシグナルの両立を達成した。

【0040】

実施例 8

実施例7における各工程のうち、(4) 負に帯電することが可能な官能基の導入を実施例2と同様の方法で行った。

本実施例では、実施例7と同様にLinking試薬を用いずに一本鎖核酸プローブを支持体上に直接固定化した後、実施例2の方法で一本鎖核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な硫酸水素基を導入した。本実施例でも実施例1と同様の効果で高いハイブリダイゼーションシグナルと低いバックグラウンドシグナルの両立を達成した。

【0041】

実施例 9

実施例4に示した(1)～(4)の方法を用いて、図4に示したようなスライドガラス1枚あたりに200種類の一本鎖核酸プローブが固定化された核酸マイクロアレイを作成した。なお、核酸プローブとして実施例1に示した方法で合成した末端がチオール基で修飾された25塩基長の一本鎖核酸プローブを用いた。また、上記200種類の核酸プローブの塩基配列として、表1～8に示した200種類の各遺伝子断片がそれぞれ持つ固有の連続した25塩基配列を用いた。

【0042】

【表1】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (1)

GenBank	遺 伝 子 名
A03911	ヒトグリア由来軸索促進因子 (GdNPF) mRNA
A26792	ヒト CNTF コーディング配列 (b+c 型) (comp.)
AB003791	ヒトケラタン硫酸 Gal-6-スルホトランスフェラーゼ mRNA
AB012192	ヒトコンドロイチン 6-スルホトランスフェラーゼ mRNA
AF000546	ヒトブリン受容体 P2Y5 mRNA
AF000974	ヒトザイキシン関連タンパク質 ZRP-1 mRNA
AF001954	ヒト成長インヒビター p33ING1(ING1) mRNA
AF004430	ヒト hD54+ins2 イソ型 (hD54) mRNA
AF007111	ヒト MDM2 様 p53 結合タンパク質 (MDMX) mRNA
AF009674	ヒト axin (AXIN) mRNA
AF010127	ヒト Casper mRNA
AF010310	ヒト p53 誘導性タンパク質 mRNA 部分 cds
AF013168	ヒトハマーチン (hamartin) (TSC1) mRNA
AF015950	ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTRT) mRNA
AF016267	ヒト TRAIL 受容体 3 mRNA
AF016268	ヒトデス (death) 受容体 5 (DR5) mRNA
AF016582	ヒトチェックポイントキナーゼ Chk1 (CHK1) mRNA
AF018253	ヒト核因子 κ B 受容体アクチベーター (RANK) mRNA
AF019770	ヒトマクロファージ阻害性サイトカイン 1 (MIC-1) mRNA
AF019952	ヒト腫瘍抑制性 STF cDNA1 (TSSC1) mRNA
AF022109	ヒト HsCdc18p (HsCdc18) mRNA
AF022224	ヒト Bcl-2-結合タンパク質 (BAG-1) mRNA
AF026816	ヒト推定癌遺伝子タンパク質 mRNA 部分 cds
AF029403	ヒトオキシステロール 7 α ヒドロキシラーゼ (CYP7b1) mRNA
AF037195	ヒト G タンパク質シグナリングレギュレーター RGS14 mRNA
AF038009	ヒトチロシルタンパク質スルホトランスフェラーゼ-1 mRNA
AF040705	ヒト推定腫瘍抑制タンパク質非スプライス型 (Fus-2) mRNA
AF040707	ヒト腫瘍抑制遺伝子候補 21 タンパク質イソ型 I mRNA

【0043】

【表2】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (2)

GenBank	遺 伝 子 名
AF043254	ヒトヒートショックタンパク質 75 (hsp75) mRNA
AF049891	ヒトチロシルタンパク質スルホトランスフェラーゼ 2 mRNA
AF053712	ヒトオステオプロテジェリンリガンド mRNA
AF055584	ヒト SULT1C スルホトランスフェラーゼ (SULT1C) mRNA
AF059195	ヒト塩基性ロイシンジッパー転写因子 MafG (MAFG) mRNA
AF061836	ヒト推定腫瘍抑制タンパク質 (RDA32) mRNA
AF067512	ヒト PITSRE タンパク質キナーゼ α SV1 イソ型 (CDC2L1) mRNA
AF067519	ヒト PITSRE タンパク質キナーゼ β SV1 イソ型 (CDC2L2) mRNA
AF070594	ヒトクローン 24570 HNK-1 スルホトランスフェラーゼ mRNA
AF087017	ヒト H19 遺伝子完全配列
AF090318	ヒトステロール 12 α ヒドロキシラーゼ CYP8B1 (Cyp8b1) mRNA
AF112219	ヒトエステラーゼ D mRNA
AF188698	ヒトスルホトランスフェラーゼ様タンパク質 mRNA
AF237982	ヒトオキシステロール 7 α ヒドロキシラーゼ (CYP39A1) mRNA
AI445492	NCI_CGAP_Gas4 ヒト cDNA クローン IMAGE:2142448 3'mRNA 配列
AJ004832	ヒトニューロパシー標的エステラーゼ mRNA
AL021878	ヒト CYP2D7AP
AL021878	ヒト CYP2D8P
D14012	ヒト肝細胞成長因子 (HGF) アクチベーター前駆体 mRNA
D14497	ヒトプロト癌遺伝子タンパク質 mRNA
D14838	ヒト FGF-9 mRNA
D14889	ヒトスモール GTP 結合タンパク質 S10 mRNA
D16234	ヒトホスホリパーゼ C- α mRNA
D26512	ヒト膜型マトリクスメタロプロテイナーゼ mRNA
D37965	ヒト PDGF 受容体 β 様腫瘍抑制因子 (PRLTS) mRNA

【0044】

【表3】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (3)

GenBank	遺 伝 子 名
D38122	ヒト Fas リガンド mRNA
D38305	ヒト Tob mRNA
D43968	ヒト AML1b タンパク質 (選択的スプライシング産物) の AML1 mRNA
D49742	ヒト HGF アクチベーター様タンパク質 mRNA
D50310	ヒトサイクリン I mRNA
D86640	ヒト stac、完全 cds mRNA
D88667	ヒトセレブロシドスルホトランスフェラーゼ mRNA
D89479	ヒト ST1B2 mRNA
D89667	ヒト c-myc 結合タンパク質 mRNA
D90224	ヒト糖タンパク質 34 (gp34) mRNA
J02625	ヒトシトクロム P-450j mRNA
J02871	ヒト肺シトクロム P450(IVサブファミリー)BI タンパク質
J02906	ヒトシトクロム P450IIF1 タンパク質 (CYP2F) mRNA
J02958	ヒト MET プロト癌遺伝子 mRNA
J03210	ヒトコラゲナーゼタイプ IV mRNA3'末端
J03241	ヒトトランスホーミング増殖因子 $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) mRNA
J03518	ヒトエポキシドヒドロラーゼ、ミクロソーム (生体異物) (EPHX1) mRNA
J03528	ヒトカチオン非依存性マンノシド 6-ホスフェート受容体 mRNA
J03817	ヒトグルタチオントランスフェラーゼ M1B (GST1) mRNA
J03934	ヒト NAD(P)H:メナジオンオキシドレダクターゼ mRNA
J04093	ヒトフェノール UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDPGT) mRNA
J04127	ヒトアロマターゼシステムシトクロム P-450 (P450XIX) mRNA
J05070	ヒトタイプ IV コラゲナーゼ mRNA
J05459	ヒトグルタチオントランスフェラーゼ M3 (GSTM3) mRNA
K01171	ヒト HLA-DR α 鎖 mRNA
K02276	ヒト (Daudi) 転座型 t(8;14)c-myc 癌遺伝子 mRNA
K03191	ヒトシトクロム P-1-450 (TCDD 誘導性) mRNA
K03222	ヒト (細胞系 1027 F57) トランスホーミング増殖因子 α mRNA
L03840	ヒト線維芽細胞増殖因子受容体 4 (FGFR4) mRNA

【0045】

【表4】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (4)

GenBank	遺 伝 子 名
L04288	ヒトシクロフィリン関連タンパク質 mRNA
L04751	ヒトシトクロム p-450 4A (CYP4A) mRNA
L05779	ヒトサイトゾルエポキシドヒドロラーゼ mRNA
L06895	ヒト myc 転写活性 (Mad) アンタゴナイザー mRNA
L07594	ヒトトランスホーミング増殖因子 β タイプ III 受容体 (TGF- β) mRNA
L07765	ヒトカルボキシシルエステラーゼ mRNA
L07868	ヒト受容体チロシンキナーゼ (ERBB4) 遺伝子
L09753	ヒト CD30 リガンド mRNA
L11353	ヒトモエシン-エズリン-ラディキシン様タンパク質 mRNA
L12260	ヒト組み換えグリア増殖因子 2 mRNA 及び隣接領域
L12964	ヒト活性化依存型 T 細胞 mRNA
L13286	ヒトミトコンドリア 125-ジヒドロキシビタミン D3 24-ヒドロキシラーゼ mRNA
L13972	ヒト β -ガラクトシド α -23-シアリルトランスフェラーゼ (SIAT4A) mRNA
L15409	ヒトフォン・ヒッペル-リンダウ病腫瘍サプレッサー mRNA 配列
L17075	ヒト TGF- β スーパーファミリー受容体タイプ I mRNA
L19063	ヒトグリア由来神経栄養因子遺伝子
L19067	ヒト HF- κ -B 転写因子 p65 サブユニット mRNA
L20320	ヒトタンパク質セリン/スレオニンキナーゼ stk1 mRNA
L22005	ヒトユビキチンコンジュゲート酵素 mRNA
L22474	ヒト Bax β mRNA
L25610	ヒトサイクリン依存型キナーゼ阻害剤 mRNA
L25676	ヒト CDC2 関連キナーゼ (PITALRE) mRNA
L25851	ヒトインテグリン α E 前駆体 mRNA
L27211	ヒト CDK4 インヒビター (p16-INK4) mRNA
L29216	ヒト clk2 mRNA

【0046】

【表5】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (5)

GenBank	遺 伝 子 名
L29220	ヒト clk3 mRNA
L29222	ヒト clk1 mRNA
L29277	ヒト DNA 結合タンパク質 (APRF) mRNA
L32179	ヒトアリアルアセトアミドデアセチラーゼ mRNA
L33264	ヒト CDC2 関連タンパク質キナーゼ (PISSLRE) mRNA
L35253	ヒト p38 マイトジェン活性化型タンパク質 (MAP) キナーゼ mRNA
L40027	ヒトグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 mRNA
L78440	ヒト STAT4 mRNA
M10988	ヒト腫瘍壊死因子 (TNF) mRNA
M11730	ヒトチロシンキナーゼ型受容体 (HER2) mRNA
M12272	ヒトアルコールデヒドロゲナーゼクラス I γ サブユニット (ADH3) mRNA
M12783	ヒト c-sis/血小板由来増殖因子 2 (SIS/PDGF2) mRNA
M12963	ヒトクラス I アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1) α サブユニット mRNA
M13194	ヒト除去修復タンパク質 (ERCC1) mRNA クローン pcDE
M13228	ヒト N-myc 癌遺伝子タンパク質 mRNA
M13755	ヒトインターフェロン誘導型 17-kDa/15-kDa タンパク質 mRNA
M14505	ヒト (クローン PSK-J3) サイクリン依存型タンパク質キナーゼ mRNA
M14564	ヒトシトクロム P450c17 (ステロイド 17- α -ヒドロキシラーゼ/1720 リアーゼ) mRNA
M14695	ヒト p53 細胞性腫瘍抗原 mRNA
M14745	ヒト bcl-2 mRNA
M14764	ヒト神経増殖因子受容体 mRNA
M15024	ヒト c-myb mRNA
M15400	ヒト網膜芽腫感受性 mRNA
M16038	ヒトチロシンキナーゼをコードする lyn mRNA
M17016	ヒトセリンプロテアーゼ様タンパク質 mRNA
M17252	ヒトシトクロム P450c21 mRNA 3'末端
M18112	ヒトポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ mRNA

【0047】

【表6】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (6)

GenBank	遺 伝 子 名
M18737	ヒト Hanukah 因子セリンプロテアーゼ (HuHF) mRNA (細胞障害性Tリンパ球結合セリンプロテアーゼ)
M19154	ヒトトランスポーミング増殖因子- β -2 mRNA
M19720	ヒト L-myc タンパク質遺伝子
M19722	ヒト p55-c-fgr タンパク質をコードする fgr プロト癌遺伝子
M20403	ヒトシトクロム P450 db1 mRNA
M21574	ヒト血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFRA) mRNA
M21616	ヒト血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体 mRNA
M21758	ヒトグルタチオン S-トランスフェラーゼ A2 (GSTA2) mRNA
M22995	ヒト ras 関連タンパク質 (Krev-1) mRNA
M23619	ヒト HMG-I タンパク質イソ型 mRNA (HMGI 遺伝子) クローン 6A
M24898	ヒトトリヨードサイロニン受容体 (THRA1 ear1) mRNA
M25753	ヒトサイクリン B mRNA 3'末端
M26880	ヒトユビキチン mRNA
M27968	ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF) mRNA
M28209	ヒト GTP 結合タンパク質 (RAB1) mRNA
M28211	ヒト GTP 結合タンパク質 (RAB4) mRNA
M28215	ヒト GTP 結合タンパク質 (RAB5) mRNA
M29366	ヒト上皮増殖因子受容体 (ERBB3) mRNA
M29870	ヒト ras 関連 C3 ボツリヌストキシン基質 (rac) mRNA 変異型 1
M30496	ヒトユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ (PGP 9.5, UCH-L3) アイソザイム L3 mRNA
M30817	ヒトインターフェロン誘導型細胞性耐性メディエータータンパク質 (MxA) mRNA
M30818	ヒトインターフェロン誘導型細胞性耐性メディエータータンパク質 (MxB) mRNA
M31165	ヒト腫瘍壊死因子誘導型 (TSG-6) mRNA 断片接着受容体 CD44 推定 CDS
M31899	ヒト DNA 修復ヘリカーゼ (ERCC3) mRNA

【0048】

【表7】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (7)

GenBank	遺 伝 子 名
M32977	ヒトヘパリン結合型血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA
M33318	ヒトシトクロム P450IIA3 (CYP2A3) mRNA
M34065	ヒト cdc25Hs mRNA
M34309	ヒト上皮増殖因子受容体 (HER3) mRNA
M34641	ヒト線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体 1 mRNA
M35296	ヒトチロシンキナーゼ arg 遺伝子 mRNA
M35410	ヒトインスリン様増殖因子結合タンパク質 2 (IGFBP2) mRNA
M35416	ヒト GTP 結合タンパク質 (RALB) mRNA
M35543	ヒト GTP 結合タンパク質 (G25K) mRNA
M36542	ヒトリンパ球特異的転写因子 mRNA
M36981	ヒト推定 NDP キナーゼ (nm23-H2S) mRNA
M37825	ヒト線維芽細胞増殖因子 5 (FGF-5) mRNA
M54915	ヒト h-pim-1 タンパク質 (h-pim-1) mRNA
M54968	ヒト K-ras 癌遺伝子タンパク質 mRNA
M55618	ヒトヘキサブラキオン (HXB) mRNA
M57230	ヒト膜糖タンパク質 gp130 mRNA
M57732	ヒト肝核因子 1 (TCF1) mRNA
M58051	ヒト線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR3) mRNA
M58525	ヒトカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) mRNA
M59040	ヒト細胞接着分子 (CD44) mRNA
M59465	ヒト腫瘍壊死因子 α 誘導性タンパク質 A20 mRNA
M59964	ヒト幹細胞因子 mRNA
M60278	ヒトヘパリン結合型 EGF 様増殖因子 mRNA
M60614	ヒトウィルムス腫瘍 (WIT-1) 関連タンパク質 mRNA
M60618	ヒト核自己抗原 (SP-100) mRNA
M60718	ヒト肝細胞増殖因子 mRNA
M60828	ヒトケラチノサイト増殖因子 mRNA
M60854	ヒトリボソームタンパク質 S16 mRNA
M60915	ヒト神経線維腫症タンパク質タイプ I (NF1) mRNA

【0049】

【表8】

核酸プローブに用いた遺伝子名 (8)

GenBank	遺 伝 子 名
M60974	ヒト成長停止及び DNA 損傷誘導性タンパク質 (gadd45) mRNA
M61176	ヒト脳由来神経栄養因子前駆体 (BDNF) mRNA
M61853	ヒトシトクロム P4502C18 (CYP2C18) mRNA クローン 6b
M61854	ヒトシトクロム P4502C19 (CYP2C19) mRNA クローン 11a
M61857	ヒトシトクロム P4502C9 (CYP2C9) mRNA クローン 65
M62401	ヒトステロール 27 ヒドロキシラーゼ (CYP27) mRNA
M62829	ヒト転写因子 ETR103 mRNA
M63167	ヒト rac タンパク質キナーゼ α mRNA
M64240	ヒトヘリックス-ループ-ヘリックスジッパータンパク質 (max) mRNA
M64349	ヒトサイクリン D (サイクリン D1) mRNA
M68520	ヒト cdc2-関連タンパク質キナーゼ mRNA
M73791	ヒト新規遺伝子 mRNA
M73812	ヒトサイクリン E mRNA 配列

【0050】

次に、以下の方法でハイブリダイゼーション溶液を作成した。

ディッシュ内に約 2×10^6 個のすい臓ガン細胞 (American Type Culture Collection社製、CFPAC1) と10mlの培地を加え、二日に一度培地を交換しながら37℃で一週間細胞を培養した。なお、培地としてD-MEM (ライフテック オリエンタル社製) とFetal Bovine Serum, Qualified (ライフテック オリエンタル社製) の9:1混合液を用いた。培養後、ディッシュから培地を取り除き、さらにGTC溶液 (グアニジンチオシアネート; 4M、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン; 0.1M、2-メルカプトエタノール; 1%、pH7.5) を加え培養細胞を溶解した。次に、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように加えた後、5000r.p.m.で10分間遠心してから上清液を取り出した。得られた上清液に5.7Mの塩化セシウム溶液を上清液と塩化セシウム溶液の比が7:3になるように加えた後、さらに適量の軽質流動パラフィンを加え35000r.p.m.で12時間遠心した。遠心後、下層に沈殿しているRNAペレットを取り出した。得られたRNAペレットを適量のTES溶液 (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン; 10mM、エチレンジアミン四酢酸; 5mM、ドデシル硫酸ナトリウム; 1%、pH7.4) に溶解した後、エタノー

ル沈殿を行ってRNAペレットを濃縮・精製した。次に、精製されたRNAペレットをDEPC溶液（二酸化ジエチル；0.1%）に溶解した後、m-RNA精製キット（Invitrogen社製、Micro-FastTrack2.0 Kit）を用いてRNAペレットからmRNAを取り出した。得られたmRNAを $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈した後、希釈液 $1\mu\text{l}$ に $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の Oligo dTプライマー（ライフテック オリエンタル社製） $1\mu\text{l}$ とDEPC溶液 $5\mu\text{l}$ を加え 70°C で5分間保温した。次に、得られた溶液 $5\mu\text{l}$ にSuperScript II バッファー（ライフテックオリエンタル社製、Super Script II Reverse Transcriptase） $5\mu\text{l}$ 、dNTP mixture（ 2mM dUTP、 5mM dATP、 5mM dGTP、 5mM dCTP） $2\mu\text{l}$ 、 100mM DTT（ジチオスレイトール） $2\mu\text{l}$ 、 40U Rnasin（TOYOBO社製 Rnase阻害剤） $2.5\mu\text{l}$ 、 1mM FluoriLink dUTP（アマシャムファルマシア社製、FluoroLink Cy5-dUTP） $2\mu\text{l}$ 、及びSS II（ライフテックオリエンタル社製、Super Script II Reverse Transcriptase） $1\mu\text{l}$ を混合した後、 42°C で30分間保温した。その後、さらにSS II（ライフテックオリエンタル社製、Super Script II Reverse Transcriptase）を $1\mu\text{l}$ 加え再び 42°C で30分保温した。保温後の溶液にDEPC溶液 $20\mu\text{l}$ 、 0.5M エチレンジアミン四酢酸 $5\mu\text{l}$ 、及び 1N の水酸化ナトリウム水溶液 $10\mu\text{l}$ を加え 65°C で60分保温した後、 1M のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝溶液（ $\text{pH}7.5$ ）を $25\mu\text{l}$ 加え中和した。その後、中和したサンプル溶液をMicrocon-30（Amicon社製）に入れ 8000r.p.m. で4分間遠心した後 $10\sim 20\mu\text{l}$ に濃縮して未反応のdNTPを除去した。得られた溶液、 $20\times$ Denhardt's solution（SIGMA社製）、 $20\times$ SSC、及びドデシル硫酸ナトリウムを適量混合し、最終濃度が $100\text{pg}/\mu\text{l}$ 核酸ターゲット、 $2\times$ Denhardt's solution、 $4\times$ SSC、 0.2% ドデシル硫酸ナトリウムとなるようなハイブリダイゼーション溶液 $24.5\mu\text{l}$ を作成した。

【0051】

次に、前述の方法で得られた核酸マイクロアレイとハイブリダイゼーション溶液を用いて以下のようなハイブリダイゼーション反応を行った。

ハイブリダイゼーション溶液を 95°C で一分間熱変性した後、スライドガラス上にハイブリダイゼーション溶液を滴下しカバーガラスを乗せた。その後、スライドガラスを 40°C の恒温槽内に12時間放置してハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、 $20\times$ SSCの10倍希釈液と 10% ドデシル硫酸ナ

トリウム水溶液の300倍希釈液との混合液中にスライドガラスを浸してカバーガラスをはずした後、20×SSCの100倍希釈液でスライドガラスを洗浄した。次に、マイクロタイタープレート用遠心機を用いてスライドガラス上の水分を除いた後、マイクロアレイ用スキャナー（GSI Lumonics社製 Scan Array 5000）を用いて200点のスポットの蛍光強度（ハイブリダイゼーションシグナル）と核酸プローブが固定化されていない領域の蛍光強度（バックグラウンドシグナル）を測定した。各スポットについて、得られたハイブリダイゼーションシグナルからバックグラウンドシグナルを差し引いて200点の発現量を求めた。上記ハイブリダイゼーション反応を合計2回行い、各点についてそれぞれ1回目の発現量を横軸に、また2回目の発現量を縦軸取って、図5に示すようなスキャッチャードプロットを得た。

【0052】

本実施例では、実施例4に示した方法の一本鎖核酸プローブが共有結合で固定化され、且つ核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な官能基が導入されたマイクロアレイを作成し、これを用いてすい臓ガン細胞の発現解析を行い解析データの再現性を確認した。本実施例のマイクロアレイは高いハイブリダイゼーションシグナルと低いバックグラウンドシグナルの両立を達成しているため核酸ターゲットの検出感度が向上しており、この効果で本実施例の結果である図5と比較例4の結果である図8を比較すれば明らかなように、蛍光強度が1000以下である発現量が低い領域での再現性のばらつきを抑えることができた。

【0053】

実施例10

実施例5に示した（1）～（4）の方法を用いて、図4に示したようなスライドガラス1枚あたりに200種類の一本鎖核酸プローブが固定化された核酸マイクロアレイを作成した。なお、核酸プローブ、ハイブリダイゼーション溶液は実施例9に示したものを用い、ハイブリダイゼーション反応も実施例9と同様に行った。得られた結果を図6に示した。

本実施例では実施例5に示した方法でマイクロアレイを作成し、実施例9の方

法で発現解析を行い再現性の確認を行った。本実施例でも実施例9と同様の効果で再現性のばらつきを抑えることができた。

【0054】

実施例11

実施例6に示した(1)～(4)の方法を用いて、図4に示したようなスライドガラス1枚あたりに200種類の一本鎖核酸プローブが固定化された核酸マイクロアレイを作成した。なお、核酸プローブ、ハイブリダイゼーション溶液は実施例9に示したものを用い、ハイブリダイゼーション反応も実施例9と同様に行った。得られた結果を図7に示した。

本実施例では実施例6に示した方法でマイクロアレイを作成し、実施例9の方法で発現解析を行い再現性の確認を行った。本実施例でも実施例9と同様の効果で再現性のばらつきを抑えることができた。

【0055】

比較例1

(1) 支持体洗浄

市販のスライドガラス (Gold Seal Brand社製; 3010) をアルカリ溶液 (水酸化ナトリウム; 50g、蒸留水; 150ml、95%エタノール; 200ml) に室温で2時間浸した。その後、蒸留水中に移し3回リンスしてアルカリ溶液を完全に除去した。

(2) 二本鎖cDNAプローブを固定化するための官能基の導入

洗浄したスライドガラスを10%のポリ-L-リジン (シグマ社製; P8920) 水溶液に1時間浸した後、スライドガラスを引き出しマイクロタイタープレート用遠心機を用いて500r.p.m.で1分間遠心してポリ-L-リジン水溶液を除去した。次に、スライドガラスを吸引式恒温機に入れ、40℃で5分間乾燥させスライドガラス上にアミノ基を導入した。

【0056】

(3) 二本鎖cDNAプローブの固定

プラスミドDNAを鋳型にPCR法を用いて下記に示した配列を有する二本鎖cDNAプローブを作成した。次に、作成したcDNAプローブとジメチルスルホキシドを混合しスポッティング溶液 (cDNAプローブ; 0.1 μ g/ μ l、ジメチルスルホキシド; 50

%)を作成した後、得られたスポッティング溶液をスポッタ（日立ソフト社製 S PBIO 2000）を用いてスライドガラス上の任意の点にスポッティングした。

二本鎖cDNAプローブ配列；

GGTCGGTTTCAGGAATTTCAAAAGAAATCTGACGTCAATGCAATTATCCATTATTTAAAAGCTATAAAAAATA
GAACAGGCATCATTAACAAGGGATAAAAGTATCAATTCTTTGAAGAAATTGGTTTTAAGGAACTTCGGAGA
AAGGCATTAGATCTGGAAAGCTTGAGCCTCCTTGGGTTCGTCTATAAATTGGAAGGAAATATGAATGAAGCC
CTGGAGTTACTATGAGCGGGCCCTGAGACTGGCTGCTGACTTTGAGAACTCTGTGAGACAAGGTCCTTAGGC
ACCCAGATATCAGCC（配列番号2）

【0057】

（4）ブロッキング処理

cDNAプローブがスポッティングされたスライドガラスを60℃の蒸留水が入ったトレイの上で一分間保持した後、水蒸気の曇りが消えるまで95℃のホットプレート上に乗せた。その後、スライドガラスをUVクロスリンク機で60mJ照射してから、スライドガラスをブロッキング処理液（無水コハク酸；5g、N-メチル-ピロリジノン；315ml、0.2M 四ホウ酸ナトリウム；35ml）に15分浸した。スライドガラスをブロッキング処理液から取り出した後、95℃の蒸留水に2分間、さらに95%エタノールに1分間浸した。その後、マイクロタイタープレート用遠心機を用いて、500r.p.m.で1分間遠心してスライドガラス上のエタノールを除去した。

【0058】

（5）ハイブリダイゼーション反応

逆転写反応を用いて上記のcDNAプローブ配列と相補的な配列を持つCy3が取り込まれた核酸ターゲットを作成した。得られた核酸ターゲットと20×SSCと10%ドデシル硫酸ナトリウムを適量加えハイブリダイゼーション溶液（核酸ターゲット；100pg/ μ l、3.4×SSC、ドデシル硫酸ナトリウム；0.3%）を作成した。その後、スライドガラス上に調整したハイブリダイゼーション溶液を滴下しカバーガラスを乗せた後、62℃の恒温槽内に12時間放置してハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、20×SSCの10倍希釈液と10%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液の300倍希釈液との混合液中にスライドガラスを浸してカバーガラスをはずした後、20×SSCの100倍希釈液でスライドガラスを洗浄した。最

後に、マイクロタイタープレート用遠心機を用いてスライドガラス上の水分を除いた後、マイクロアレイ用スキャナー（GSI Lumonics社製 Scan Array 5000）を用いてcDNAプローブが固定化された領域の蛍光強度（ハイブリダイゼーションシグナル）とcDNAプローブが固定化されていない領域の蛍光強度（バックグラウンドシグナル）を測定して、結果を図2及び図3に示した。

【0059】

本比較例では二本鎖cDNAプローブが支持体上に静電的に結合したマイクロアレイを作成し、実施例との比較を行った。比較例ではブロッキング処理やハイブリダイゼーション時に核酸プローブがはがれてしまうためハイブリダイゼーションシグナルが低くなった。また、ブロッキング処理も不十分であるためバックグラウンドシグナルも高くなった。

【0060】

比較例2

実施例4における各工程のうち、（4）負に帯電することが可能な官能基の導入を以下に示した（4'）ブロッキング処理に変更した。

（4'）ブロッキング処理

牛血清アルブミン（SIGMA社製、ALBUMIN BOVINE）が10mg/ml、SSC濃度が3.5×SSCであるブロッキング処理液を作成した。核酸プローブが固定化されたスライドガラスを40℃のブロッキング処理液中に6時間浸した。

【0061】

本比較例では一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化した後、核酸プローブが固定化されていない領域に牛血清アルブミンを導入して核酸ターゲットの吸着を防止するためのブロッキング処理を行った。バックグラウンドシグナルは牛血清アルブミンを導入することで若干低くなったが、牛血清アルブミンの分子量が大きく核酸ターゲットが核酸プローブに近づく時の立体障害となるためハイブリダイゼーションシグナルは低くなった。

【0062】

比較例3

実施例4における各工程のうち、（4）負に帯電することが可能な官能基の導

入を以下に示した（４'）ブロッキング処理に変更した。

（４'）ブロッキング処理

核酸プローブが固定化されたスライドガラスをHEPES緩衝溶液でpHが6.5に調整された100mM 2-メルカプトエタノール（和光純薬社製）溶液に2時間浸した。

【0063】

本比較例では一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化した後、核酸プローブが固定化されていない領域に2-メルカプトエタノールを用いてアルコール性水酸基を導入し、核酸ターゲットの吸着を防止するためのブロッキング処理を行った。一本鎖核酸プローブを共有結合で固定化することで核酸プローブのはがれを防止することができ、高いハイブリダイゼーションシグナルを得ることができたが、導入されたアルコール性水酸基が水溶液中でほぼ中性であるため、ブロッキング効果が不十分でありバックランドシグナルが高くなった。

【0064】

比較例4

比較例1に示した（1）～（4）の方法を用いて、図4に示したようなスライドガラス1枚あたりに200種類の核酸プローブが固定化された核酸マイクロアレイを作成した。なお、核酸プローブとして比較例1に示したPCR法を用いて塩基長が200～400である二本鎖cDNAプローブを作成した。また、200種類のcDNAプローブが持つそれぞれの塩基配列として、表1～8に示した200種類の各遺伝子断片がそれぞれ持つ固有の連続した200～400塩基配列を用いた。次に、実施例9に示したハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイゼーション反応を行い、各スポットについて、得られたハイブリダイゼーションシグナルからバックグラウンドシグナルを差し引いた200点の発現量を求めた。上記ハイブリダイゼーション反応を合計2回を行い、各点についてそれぞれ1回目の発現量を横軸に、また2回目の発現量を縦軸取って、図8に示すようなスキッチャードプロットを得た。

【0065】

本比較例では比較例1に示した方法の二本鎖cDNAプローブが支持体上に静電的に結合したマイクロアレイを作成し、これを用いてすい臓ガン細胞の発現解析を行い解析データの再現性を確認した。本比較例のマイクロアレイは核酸ターゲッ

トの検出感度が低いため、これを用いた核酸ターゲットの検出では蛍光強度が1000以下である発現量が低い領域での再現性のばらつきが大きかった。

【 0 0 6 6 】

【発明の効果】

以上説明した様に、本発明では共有結合で支持体上に固定化された一本鎖核酸プローブと核酸ターゲットをハイブリダイズすることで、核酸プローブのはがれを防止すると同時にハイブリダイゼーションの効率を高め、核酸ターゲットの検出量を増やすことができる。また、核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な官能基または加水分解することで負に帯電している官能基を導入することで核酸ターゲットの吸着を抑制してノイズを減らすことができる。上記二つの効果により核酸ターゲットの検出感度を高めることができる。また、これを用いた核酸検出では検出感度を高めることにより解析データの再現性を高め信頼性の高い解析データを得ることができる。

【 0 0 6 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hitachi, Ltd.

<120> A Nucleic Acid Microarray and A Method for detecting Nucleic Acid Using the Same

<130> H002034

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Nucleic Acid Probe

<400> 1

gacacagcag gtcaagagga gtaca

25

<210> 2

<211> 303

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Double Strand cDNA Probe

<400> 2

ggtcggtttc aggaatttca aaagaaatct gacgtcaatg caattatcca ttatttaaaa 60
gctataaaaa tagaacaggc atcattaaca agggataaaa gtatcaattc tttgaagaaa 120
ttggttttta ggaaacttcg gagaaaggca ttagatctgg aaagcttgag cctccttggg 180
ttcgtctata aattggaagg aaatatgaat gaagccctgg agttactatg agcgggccct 240
gagactggct gctgactttg agaactctgt gagacaaggt ccttaggcac ccagatatca 300
gcc

303

【 0 0 6 8 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 核酸プローブ

配列番号 2 : 二本鎖cDNAプローブ配列

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の核酸マイクロアレイの製法及び構造の一例を模式的に示す。

【図 2】

実施例 1～8 及び比較例 1～3 で得られたハイブリダイゼーション後の核酸プローブが固定化された領域の蛍光強度を示したグラフである。

【図 3】

実施例 1～8 及び比較例 1～3 で得られたハイブリダイゼーション後の核酸プローブが固定化されていない領域の蛍光強度を示したグラフである。

【図 4】

本発明の核酸マイクロアレイの一実施例を概略的に示した図である。

【図 5】

実施例 9 で得られた 200 スポットの蛍光強度について、一回目の実験の蛍光強度を横軸に二回目の実験の蛍光強度を縦軸に取ったスキャッチャードプロット図である。

【図 6】

実施例 10 で得られた 200 スポットの蛍光強度について、一回目の実験の蛍光強度を横軸に二回目の実験の蛍光強度を縦軸に取ったスキャッチャードプロット図である。

【図 7】

実施例 11 で得られた 200 スポットの蛍光強度について、一回目の実験の蛍光強度を横軸に二回目の実験の蛍光強度を縦軸に取ったスキャッチャードプロット図である。

【図 8】

比較例 1 で得られた 200 スポットの蛍光強度について、一回目の実験の蛍光強度を横軸に二回目の実験の蛍光強度を縦軸に取ったスキャッチャードプロット図である。

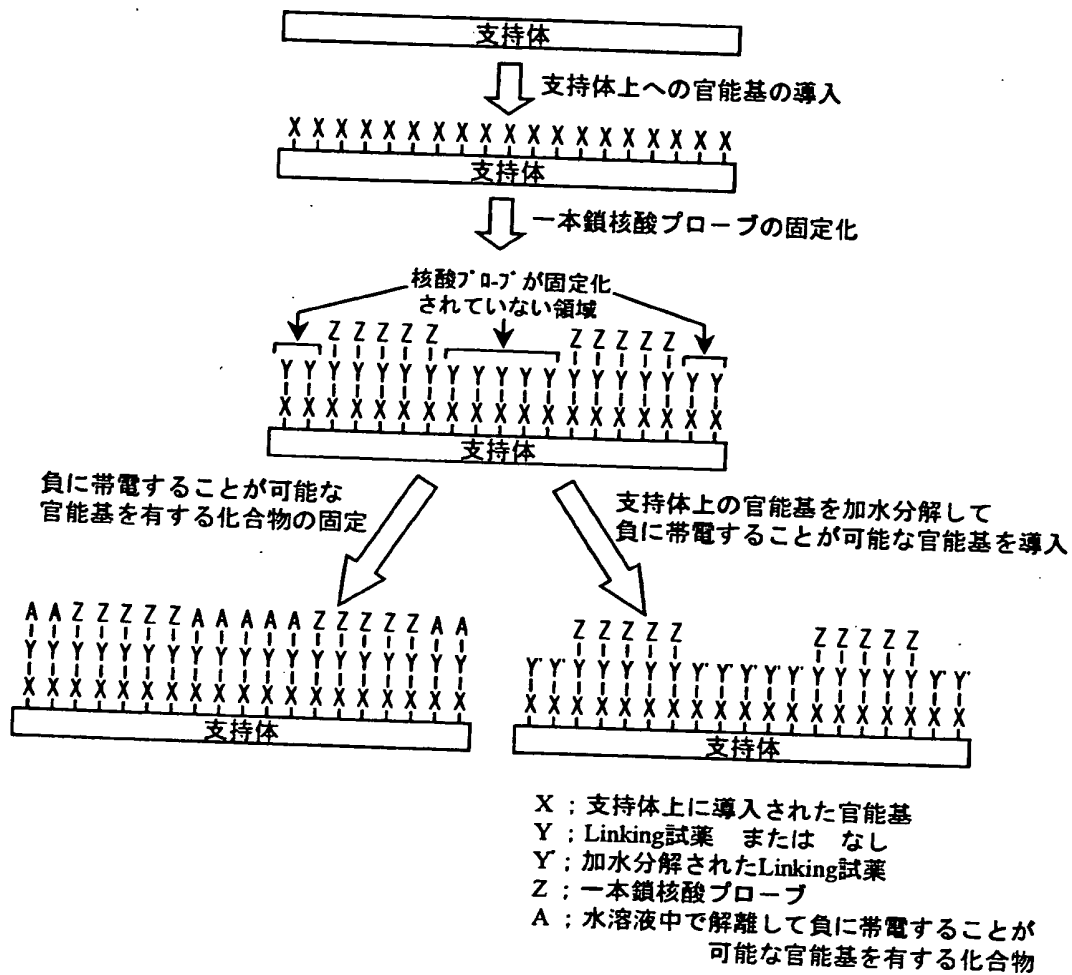
【符号の説明】

1 . . . スライドガラス、 2 . . . スポット

【書類名】

図面

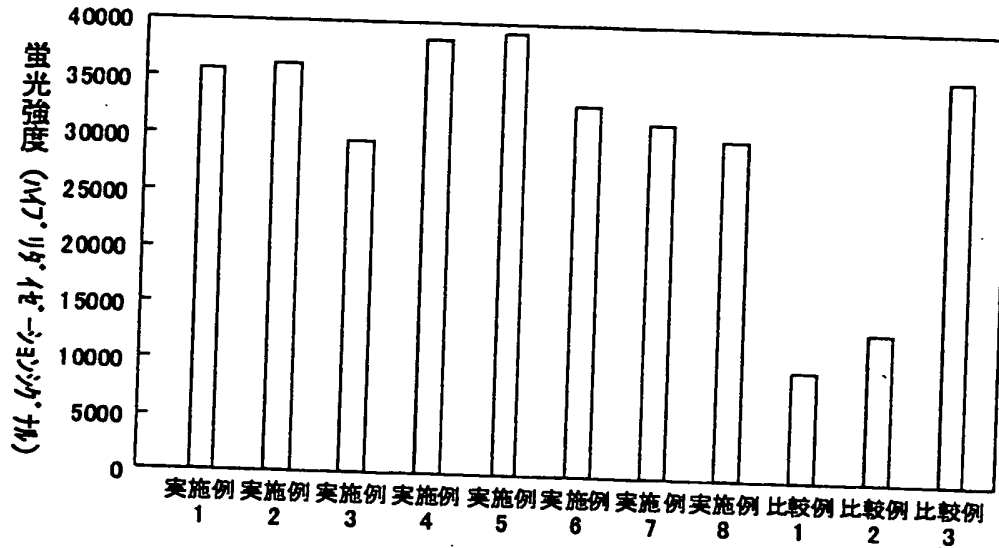
【図 1】



【図2】

実施例1～8及び比較例1～3の

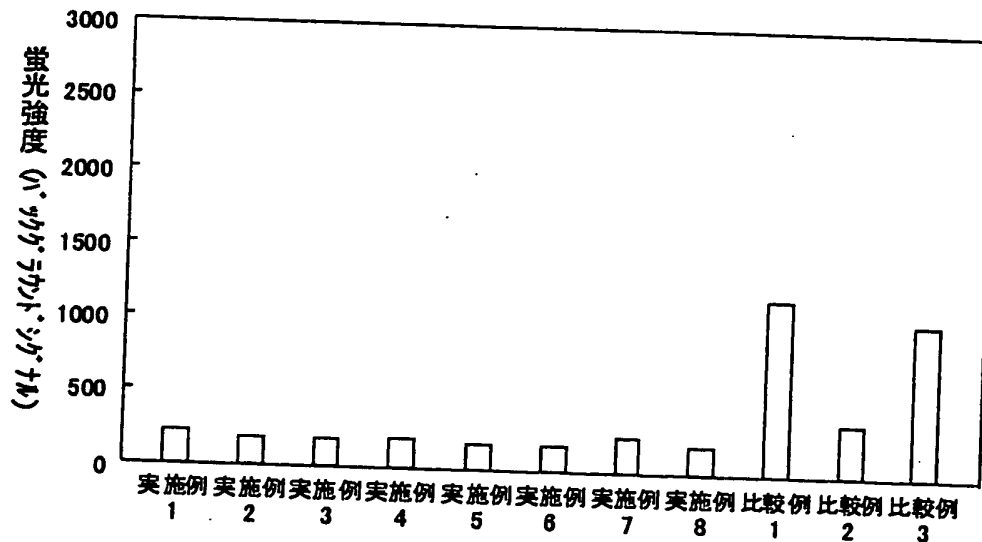
ハイブリダイゼーションシグナル



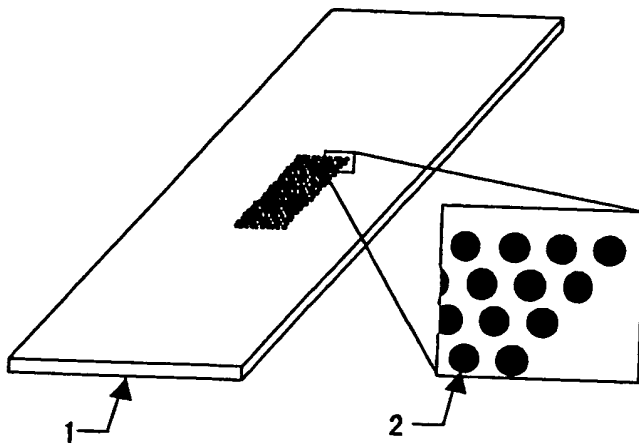
【図3】

実施例1～8及び比較例1～3の

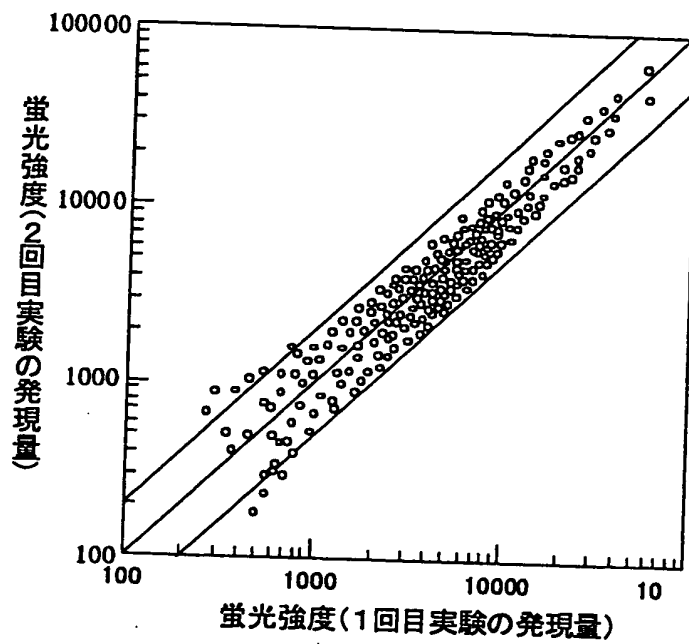
バックグラウンドシグナル



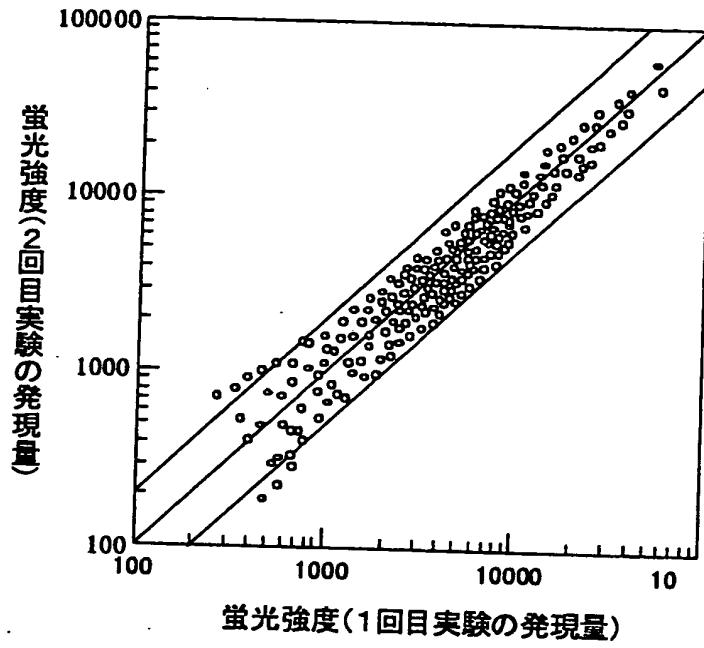
【図4】



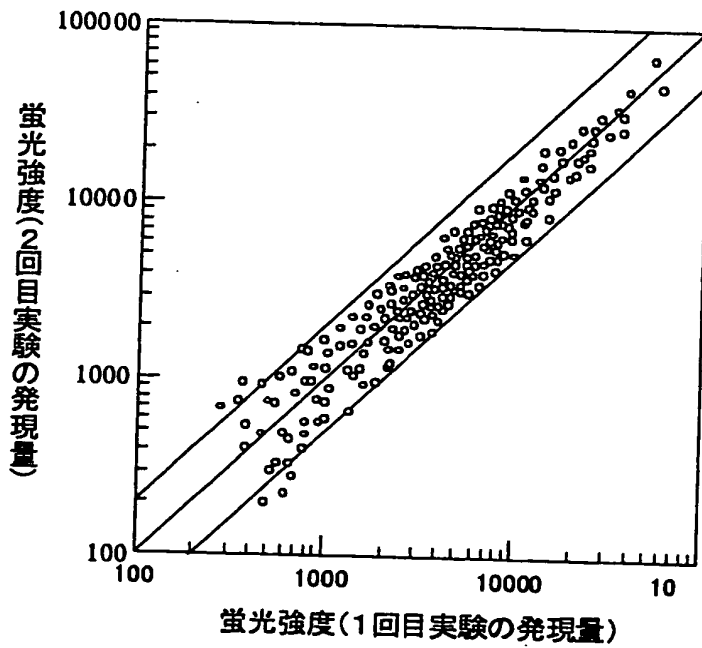
【図5】



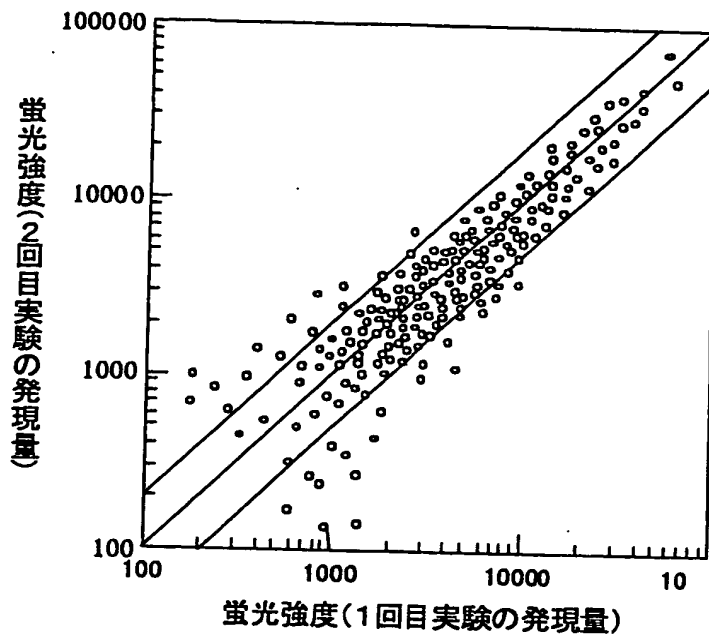
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸ターゲットに対してハイブリダイゼーション可能な多種類の核酸プローブが支持体上のそれぞれ異なる位置に固定化された核酸マイクロアレイにおいて、核酸ターゲットの検出感度を高めた核酸マイクロアレイを提出する。

【解決手段】 支持体上に一本鎖核酸プローブ共有結合で固定化すると同時に、該支持体上の核酸プローブが固定化されていない領域表面に水溶液中で解離して負に帯電することが可能な官能基または加水分解して負に帯電することが可能な官能基を導入する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日 1990年 8月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名 株式会社日立製作所